

AB

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平4-503945

⑬ 公表 平成4年(1992)7月16日

⑭ Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

A 61 K 43/00  
31/557  
31/70

8415-4C  
7252-4C  
8317-4C※

予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

(全 20 頁)

⑯ 発明の名称 血管透過性-促進接合体

⑰ 特 願 平1-511059

⑱ 出 願 平1(1989)10月11日

⑲ 翻訳文提出日 平3(1991)4月11日

⑳ 国際出願 PCT/US89/04513

㉑ 国際公開番号 WO90/03801

㉒ 国際公開日 平2(1990)4月19日

優先権主張 ㉓ 1988年10月11日 ㉔ 米国(US) ㉕ 255,513

⑳ 発 明 者 エプスタイン, アラン・エル

アメリカ合衆国、91011 カリフォルニア州、ラ・カナダ、ヒリアド・アベニュー、5128

㉑ 発 明 者 グロブスキー, マイケル・エム

アメリカ合衆国、90024 カリフォルニア州、ロス・アンジェル  
ス、マルカム・アベニュー、750

㉒ 出 願 人 ユニバーシティ・オブ・サザ  
ン・カリフォルニア

アメリカ合衆国、90007-4344 カリフォルニア州、ロス・アン  
ジェルズ、ホープ・ストリート、3716、ナンバー200

㉓ 代 理 人 弁理士 深見 久郎 外4名

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

#### 請求の範囲

1. 腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配送媒体、および前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く配送媒体に結合された薬剤を備える、薬剤接合体。

2. 前記接合体が、正常で健康な血管内皮を通過することができないが、腫瘍組織の血管内皮を通過するのに十分な大きさである、請求項1に記載の接合体。

3. 前記薬剤が、血管内皮の活性部位において、血管透過性を増加するよう働く、請求項1に記載の接合体。

4. 前記薬剤が、血管内皮の活性部位において、局所的な炎症性反応を刺激または激化するよう働く、請求項1に記載の接合体。

5. 抗腫瘍性の放射性同位体と組合わされた、請求項1、3または4に記載の接合体。

6. 抗腫瘍性の毒素と組合わされた、請求項1、3または4に記載の接合体。

7. 前記薬剤が、薬物的に活性な化合物を含む、請求項1、3または4に記載の接合体。

8. 前記薬剤が、炭水化物である、請求項1に記載の接合体。

9. 前記炭水化物が、グルカンおよびプロテオグルカンからなる群から選択される、請求項8に記載の接合体。

10. 前記薬剤が脂質である、請求項1、3または4に記載の接合体。

11. 前記脂質が、血小板活性化因子およびプロスタグランジンからなる群から選択される、請求項10に記載の接合体。

12. 前記薬剤が生物学的アミンである、請求項1、3または4に記載の接合体。

13. 前記配送媒体が、損傷を受け、炎症を起こし、または構造的に異常な血管内皮において選択的に発現される分子に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

14. 前記配送媒体が、免疫グロブリンまたはその断片を備える、請求項1、3、または4に記載の接合体。

15. 前記配送媒体が、モノクローナル抗体を備える、請求項1、3または4に記載の接合体。

16. 前記配送媒体が、1つまたは2つ以上のリポソームを備える、請求項1、3または4に記載の接合体。

17. 前記リポソームが、80nmのオーダーの直径を有する、請求項16に記載の接合体。

18. 前記配送媒体が、透過性の血管壁に選択的に集中する高分子量のデキストラン(70-150KD)を備える、請求項1、3または4に記載の接合体。

19. 前記配送媒体が、30,000と200,000との間の分子量を有する高分子または粒子を備える、請求項1、3または4に記載の接合体。

20. 前記配送媒体が、腫瘍に見られるような炎症を起こ

した血管および構造的に異常な血管において循環する抗体または他の高分子に接近するようになる血管壁の内皮下成分に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

21. 前記成分が、フィブロネクチン、ラミニン (laminin)、およびIV型コラーゲン、またはそれらの類似分子を備える、請求項20に記載の接合体。

22. 前記配達媒体が、血管壁、炎症を起こした血管壁のすぐ近くの環境、または腫瘍の壊死領域において活性化される凝固カスケードの成分に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

23. 前記成分がフィブリンおよびトロンビンを含む、請求項22に記載の接合体。

24. 前記配達媒体が、炎症を起こしていない尿管組織でなく、炎症を起こした尿管組織の内皮細胞の中または上において選択的に発現される抗原に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

25. 前記抗原が、炎症を起こした尿管組織への多形核白血球の付着の原因となる細胞付着分子を含む、請求項24に記載の接合体。

26. 前記抗原がフィブリンを備える、請求項24に記載の接合体。

27. 前記抗原がフィブロネクチンを備える、請求項24に記載の接合体。

能力を有する配達媒体およびそれに接合された検出可能な薬剤を備える接合体を前記宿主に投与するステップを備える、方法。

35. 薬剤としての使用のために、接合体を構成するための方法であって、腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体またはそれと同じものをコードするヌクレオチドを、前記腫瘍組織への血液供給を増加するように働く少なくとも1つの薬剤またはそれと同じものをコードするヌクレオチドに付加することを備える、方法。

36. 腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体に接合された、前記腫瘍組織の治療のための薬剤組成物の調製において、前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く薬剤の使用。

37. 腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体に接合された、前記腫瘍組織の診断のための組成物の調製における、前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く薬剤の使用。

38. 腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体、および前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く配達媒体に結合された薬剤を備える接合体、および

抗腫瘍性の治療薬、  
を備える治療用キット。

39. 腫瘍組織の部位に集中する能力を備える配達媒体、および前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く配達

28. 前記抗原がフィブリン分解産物を備える、請求項24に記載の接合体。

29. 前記抗原が、細胞酵素、血小板または血小板細胞生産物を備える、請求項24に記載の接合体。

30. 前記酵素が、壊死性または炎症を起こした組織において放出されるペルオキシダーゼを含む、請求項29に記載の接合体。

31. 前記配達媒体が、新しい尿管組織の内皮細胞の中または上において選択的に発現される抗原に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

32. 腫瘍組織の診断のための方法であって、

前記腫瘍組織への血液の供給を増加するように働く薬剤に接合されている抗体を前記組織の部位に集める能力を有する有効な量の配達媒体を前記組織を有する宿主に投与するステップ、および

それと同時にまたはその後、前記宿主に腫瘍の像を造る薬剤を投与するステップを備える方法。

33. 前記腫瘍の像を造る薬剤と接合された、前記組織の部位に集中する能力を有する配達媒体を備える接合体として、診断薬が投与される、請求項32に記載の方法。

34. 腫瘍組織の免疫診断のための方法であって、

有効な量の請求項1の接合体を前記組織を有する宿主に投与するステップ、および

それと同時にまたはその後、前記組織の部位に集中する

媒体に結合された薬剤を備える接合体、および

腫瘍の像を造る薬剤、  
を備える診断用キット。

## 明 願 書

## 血管透過性-促進接合体

## 発明の分野

この発明は、免疫学的薬剤および生体内においてユニークな特異性を有するその他の薬剤の使用に関し、特に、人の疾患の診断および治療のために用いられるモノクローナル抗体およびその他の高分子の浸透および結合を促進するための手段に関する。

## 関係出願とのつながり

この出願は、1988年10月11日、アラン (Alan) L. エプスタイン (Epstein) およびマイケル (Michael) グロブスキー (Glovsky) の名前で、「血管透過性促進免疫接合体」と題されて出願された米国出願通称番号 255, 513 の一部継続出願である。出願通称番号 255, 513 における主題と共通のこの出願における主題の優先権がここに主張される。

## 発明の背景

いくつかの異なるタイプの人の癌に向けられた治療において、腫瘍特異的なモノクローナル抗体 (mAbs) の使用が積極的に研究されてきた (レビーおよびミラー (Levy) および Miller)、Fed. Proc. 42: 2650-2656 (1983)、また現在のところ、多くの臨床試験が報告されてきた。臨床試験のフェイズ I および II の両方のレベルは、高い投与レベルにおいてもこれらの薬剤の安全性が納得のいくよう示されてきたが、それ

らは、モノクローナル抗体 ("mAbs") が生体内で予測されたように効果的ではなかったことも示している。

癌の治療において、腫瘍に結合された抗原に対する抗体の効果は、抗体が直接的な細胞障害性または補体により媒介される細胞の溶解のいずれかによりそれらの標的細胞を破壊する抗体の能力に依存している。補体により介在される溶解は、古典的な補体経路の C1q 成分が腫瘍細胞の表面に結合された抗体の Fc 部に結合し、膜攻撃複合体の形成に導くときに誘発される。腫瘍に結合された抗体は、それ自身が標的を溶解するエフェクタ細胞と相互に作用することにより宿主の本来の防御を増強することもできる。しかしながら、それらの複合的な細胞障害性の能力にもかかわらず、細胞障害性の薬剤として mAbs 単独の実験的効果の使用は、不満足なものであった。試験はいくらかの鎮静を結果としてもたらしてきたが、一般的に、ほとんどの患者は、しばしば一時的な軽い応答を有するだけであった (フーン (Foon) 等、Blood 64: 1086-1093 (1984); シアーズ (Sears) 等、Cancer Res. 45: 5910-5913 (1985))。

研究者らは、抗体分子そのものの細胞障害性を、細胞障害性の放射性核種、毒素、およびそれらに付加された薬剤を用いて補うことにより、モノクローナル抗体の治療上の能力を改善しようと試みてきた (ドナルド (DeNard

o)、S. 等、Nucl. Med. Biol. 13: 303-310 (1986); ハーウィッツ (Hurwitz) , E. 等、Cancer Research 35: 1175-1181 (1975); ゴース (Ghose) , T. 等、J. Natl. Cancer Inst. 58: 845-852 (1977))。

mAbs の殺腫瘍能力の改善のための試みは、抗体結合部位において、局所的な本来の免疫応答をも刺激するような抗体接合体を提供するために、生物学的応答修飾物を付与することも含んできた。

この生物学的応答修飾物の使用の一例は、抗体とコブラ毒因子 (CVF) の接合体である。CVF は糖タンパク質であり、補体の代替的な経路の C3b、C3/C5 変換酵素の性質を有している。しかしながら、CVF はその本来の類似体と異なって、補体制御タンパク質により不活性化されない。細胞により結合された抗体上での CVF の存在は、膜攻撃複合体の組立てを開始し、かつそれにより細胞を殺す (ボーゲル (Vogel) , C. およびミュラー-エベルハート (Muller-Eberhard) , H. , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78 (12): 7707-7711; ボーゲル (Vogel) , C. 等、「血液学および輸血」、人白血病における最近の傾向 VI (Modern Trends in Human Leukemia VI)、29: 514-517 (1

985) Berlin Neth. 等。))。

他の例は、モノクローナル抗体およびインターフェロンを含む免疫接合体の使用であり、そこにおいてインターフェロンは、ナチュラルキラー (NK) 細胞を含む予め存在する細胞の免疫機構を活性化することにより標的細胞の溶解を促進する。(フラネリ (Flannery) , G. 等、Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 20 (6): 791-798 (1984)。)

他の研究者らは、腫瘍に結合された抗体の部位において、単球/マクロファージ濃度を増加するよう作用する走化性の薬剤、ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン (fMLP) を含む免疫接合体の効果を研究してきた。(オブリスト (Obrist) , R. , サンドベルグ (Sandberg) , A. , Cellular Immunology 81: 169-174 (1983); オブリスト (Obrist) , R. 等、Bent 53: 251 (1986))。しかしながら、これらの研究のいずれもが、抗体の腫瘍治療の臨床的な有効性を実質的に改良してこなかった。

研究は、この臨床的な有効性の不足が、腫瘍部位へ不十分な量しか mAbs が配達されないことに大きく依存していることを示している。治療の前後において組織化学的な方法による腫瘍組織の試験は、高い投与レベルにおいてさえも、抗体による腫瘍の飽和は部分的にすぎないことを示

した。(ローダ (Rowder), 等, *Blood* 69: 199-210 (1987))。放射性ラベルされた抗体の調製物を用いる定量的な定量測定の研究は、用いられる抗体の高い特異性、すなわち高い腫瘍：器官の比の実現にもかかわらず、全投与量に対して非常に低い割合 (0.05-0.2%) しか腫瘍に実際に結合しないことを示してきた。腫瘍特異的なモノクローナル抗体を用いる研究は、血液に対する腫瘍の分配比が良好な場合でさえも、腫瘍1グラム当たり検出される放射性ラベルされたmAbsの量は、注入された全投与量の約0.015%であることを示している。(エペネトス (Epanetos) 等, *Cancer Research* 48: 3183-3191 (1988))。

体内において、物質の伝達および配達の最初の態様は、循環系を介してである。一般的に、循環系は血管系およびリンパ系を備えている。栄養物質、酸素、ホルモンおよびその他の物質を体のすべての部分に運ぶ一方、細胞の代謝産物を除く血管系は、心臓ならびに一連の尿管：動脈、静脈および毛細管を含む。枝分かれにより定常的に数が増加し、かつ内径が減少する動脈は、血液を心臓から毛細管へと導く。血液と他の組織との間において成分の交換が起こる毛細管は、管を網状につないだ網状組織を形成している。一方、静脈は血液を毛細管から心臓へと戻している。

毛細管は、循環系の動脈および静脈側に接続する単純な

内皮細胞から典型的になっている。毛細管ネットワークの網状組織は、異なる組織および器官において異なるサイズおよび形状で体内全体に存在している。ある領域における代謝の強さは、一般的にこの網状組織の緊密さを一般的に決定する。したがって、肺、肝臓、腎臓、粘膜、腸および骨格筋においては、脳の灰白質と同様に緊密なネットワークが存在する。このネットワークは、臓、神経、平滑筋および漿膜のような組織においては、大きな網目を有しかつまばらである。

毛細管の壁を介する物質の輸送能力は、透過性として言及される。透過性は、場所によって異なり、かつ違う条件下でその場所において異なる。

一般的に、腫瘍が数ミリメートルの直径を超えて成長するような場合、腫瘍は新しい血液供給を誘導するに違いないことについて意見が一致しており、しかも腫瘍が尿管形成を誘導するメカニズムについて大きな注目が集められてきた。(たとえば、参照、フォルクマン (Folkman), *J. Adv. Cancer Res.* 43: 175-203 (1985))。さらに、腫瘍を補うようになる新しい血管の解剖学および生理学に大きな注目が振向けられてきた。(同上)

一般的に、腫瘍組織が解剖学的に異質な構造であることについて意見が一致している。しばしば、それらは、正常な細胞において予期されるであろう同等の大きさの管より

もより少ない周皮細胞および平滑筋細胞とともに、単純な内皮により並べられた相対的に面一的な管状構造からなる。腫瘍尿管の機能的な性質は多く論争されてきており、腫瘍尿管は正常な尿管よりも血管作動性の媒介物に対してより応答的であるかまたは応答的でないかのいずれかが報告されてきた。(参照、たとえば、ホリ (Hori), K. 等, *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 453-459 (1985))。しかしながら、ほとんどの研究者が同意している腫瘍尿管の1つの性質は、正常な尿管に比較して、腫瘍尿管は循環する高分子に対して過度に透過性であることである。固体の腫瘍におけるモノクローナル抗体および殺腫瘍剤の局在化の理解にそれが明らかに関連するため、この所見は説明を必要とする。(参照、たとえば、ドボラーク (Dvorak), 等, *Am. J. Pathol.* 133: 95-109 (1988))。小さな分子は、正常な毛細管および無償の内皮細胞接合を有する他の尿管を自由に通過するのに対して、高分子に対する正常な尿管構造の透過性は厳しく制御されている。通常、高分子は大部分が循環内に保持されており、外に出る少量のものは、小胞の輸送手段、または内皮細胞を横切る一時的な細胞質輸送経路の形成により外に出ると考えられる。(参照、たとえば、ミリシ (Millic), H. A. 等, *J. Cell Biol.* 105: 2603-2612 (1987))。しかしながら、炎症において、高分子の透過は大きく

増加し、ヒスタミンのような作動物質は毛細管の後の内皮細胞の接合を刺激して、高分子および微粒子までもが透過できるような内皮細胞のギャップの形成を結果としてもたらし。しかしながら、腫瘍の尿管構造が「漏れやすい」かそうでないかわからず、我々は、不十分な量のモノクローナル抗体しか腫瘍部位に配達されないということを多くの研究が示しているということを鑑みなければならない。

我々は、血液による腫瘍の不十分な灌流のための理由が、広く解剖学的であることを信じている。腫瘍細胞は中心の芯となる細胞から放射状に成長し、すぐに血液の供給が追付かなくなり、壊死性で低酸素の芯を残すことになる。この例の場合、芯となる細胞から最も近い毛細管までの距離は、約100ないし150 $\mu$ mであり、この距離は顕著な低酸素症および灌流の不足を招くのに大抵十分である。このような低酸素細胞は放射線照射に対して抵抗性を示し、さらに注入された薬剤または抗体が近付きにくい。(ケリン (Kaelin), W. 等, *Cancer Research* 44: 896-899 (1984); トムリンソン (Thomlinson), P. およびグレイ (Gray), L., *Br. J. Cancer* 9: 539-549 (1955))。

したがって、mAbの腫瘍治療上における制限は、まずmAbが腫瘍中に浸透しかつ腫瘍部位において局在および持続することができるような輸送に関連した因子に起因す

ることが明らかになる。腫瘍細胞へのmAbの不十分な配達および結合ならびにその臨床上的有効性における制限は、診断および治療のための抗体の使用にとって大きな障害である。放射線の化学種、化学治療剤およびmAbに付加された毒性の薬剤のような強化剤の使用は、この障害を克服しない。実際、mAbが腫瘍部位によく集中しなければ、これらの付加された強化剤は、正常な組織への損傷が増加される危険性を有している。

研究は、腫瘍組織によるmAbの取込みが、血管の透過性および血液の流れによく相関していることを示している。(サンド(Sands)等、Cancer Res., 48:188-193, (1988))。同様の研究は、血管作動性の薬剤の投与が、ある環境下で、他の組織と比べて腫瘍の灌流を増加し、かつ腫瘍の取込みおよび放射性の薬剤の濃度を増加し得ることを示している。(ボンバー(Bomber), P. 等、J. Nucl. Med., 27:243-245 (1986))。

それゆえに、この発明の目的は、治療をより効果的にするために、殺腫瘍性の免疫治療または化学治療の適用に先立って、血管の透過性を増強し、かつ腫瘍の血液量を拡大するために使用され得る特異的に目標付された薬剤を提供することにある。

また、不十分な配達に関する同様の研究は、診断像を形成する目的のために、生体内において使用される特異的に

目標付された薬剤の利用に適用される。腫瘍部位に配達された免疫診断薬の量が増加すると、診断法の精度が改善され、かつ診断薬の利用がより効果的になり、しかも放射性同位体でラベルされた抗体のような免疫診断薬がある危険を有するような場合において、患者に対する安全性はより高くなるであろう。したがって、この発明の目的は、免疫診断法に先立って、血管作動性薬剤の特異的な目標付けにより腫瘍への免疫診断薬の配達を同様に促進するであろう薬剤を提供することにある。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、ラージ(Raji)-保持マウスにおいて、放射性ラベルされたLym-1 F(ab')<sub>2</sub>マウスの取込みに関するLym/I L-2免疫複合体の効果を示している。

第2図は、リンパ腫-保持マウスにおけるI L-2およびLym-1/I L-2血管複合体の併用注入の効果を示している。

第3図は、I-125 Lym-1 F(ab')<sub>2</sub>トレーサによる腫瘍取込みに関してLym-1/I L-2血管複合体の先投与の上昇効果を示している。

第4図は、リンパ腫-保持マウスにおけるLym-1/I L-2血管複合体の投与時間の効果を示している。

#### 発明の要約

この発明は、モノクローナル抗体(mAb)に結合さ

れた血管作動応答を刺激することができる生物学的に活性な試薬を備える免疫複合体を提供する。上記mAbは、宿主の生体内に投与されたとき、腫瘍細胞または腫瘍細胞血球影のような新生物組織に選択的に結合する能力を有している。生物学的に活性な試薬は、この態様において、新生物組織の部位に局在化し、血管膨張および増強された血管透過性の手段により、または炎症性の応答メカニズムを介して、腫瘍組織への局所的な循環および血液供給が改善されるような応答を刺激する。腫瘍内における血液の体積の拡大は、続いて宿主内に導入された治療および診断のための薬剤をより完全に腫瘍に浸透させ、かつ、したがってより大量のより効果的な投与量が配達されるようになる。

いくつかのタイプの免疫治療に先立つ効果的な血管作動性複合体の使用は、その治療の効力を増強させるだけでなく、抗腫瘍剤、毒素または放射性核種のような細胞毒性物質を含む抗体複合体の使用において、有害な副作用の危険を実質的に減少させるであろう。循環内で結合されずに残っているそのような抗体複合体は、正常な組織、特に抗体複合体を必ず体から排除するような腎臓、肝臓および網内系の器官組織の意図しない破壊をもたらすであろう。標的である腫瘍に結合し得る相対的な投与量を増加することにより、血管作動性複合体は効果的でより少ない投与量の使用を可能にし、したがって結合しないまま循環する細胞障害性の薬剤の量を減らし、かつ正常な組織への危険性を減

らすことができる。

上述され、また上記において引用された我々の先の出願において開示された免疫複合体に加えて、この発明は、モノクローナル抗体、またはさらに拡張して、浸透性の膜管に局在化する他の成分(たとえば、高分子またはリポソーム)に結合された血管作動性の薬剤を備える複合体を提供する。したがって、この開示全体にわたって「免疫複合体」という用語が用いられるが、少なくとも1つの免疫活性成分からなる複合体は、この発明により意図された多くの異なる複合体の一例にすぎないことをはっきりと理解すべきである。

静脈内("I. V.")投与される場合、モノクローナル抗体は、腫瘍もしくは血管および炎症の領域において関連する構造、または血管が腫瘍部位において構造的に異常である場所に優先的に結合できる能力により選択される。血管作動性薬剤は、この態様において腫瘍または炎症の部位に選択的に集められ、そこで透過性のさらなる増加を刺激する。そのような増加は、部位に対して選択的でありかつその部位において、引続きI. V. 投与された治療剤の血液から組織への通過を容易にするように働く。

これらの血管作動性抗体複合体により誘導された選択的透過性の増強は、治療が必要とされる部位へ属しI. V. 投与された薬剤の割合または量を増加するように働く。このことは治療を強化させるだけでなく、毒性の代謝産物ま

たは免疫学的な過剰応答の発生による有害な副作用の危険性を実質的に減少させるであろう。

この発明の1つの局面に従って、腫瘍組織の部位に集まる能力を有する配送媒体、および腫瘍組織への血液供給を増加するように働く配送媒体に結合された薬剤を含む薬剤接合体が提供される。より好ましい局面において、この接合体は、正常で健康な血管内皮を透過することができない一方で、腫瘍組織の血管内皮を透過することができるに十分な大きさである。もう1つの局面において、その薬剤は、血管内皮における活性部位において血管透過性を向上するように働き、あるいは血管内皮の活性部位において局所的な炎症性の反応を刺激または激化するように働く。この発明の他の局面は、抗腫瘍性放射性同位体または抗腫瘍性トキシンを組合わせた血管接合体を提示する。もう1つの具体例において、配送媒体は、高分子または30,000と200,000との間に分子量(MW)を有する粒子を含む。

もう1つの局面において、この発明は、腫瘍細胞の診断のための方法を提案し、その方法は、抗体が腫瘍組織への血液供給を増加するように働く薬剤に接合された、その部位に集中することができる能力を有する有効な量の配送媒体を、腫瘍組織を有する宿主に投与するステップ、および同時またはその後、腫瘍の像を造る薬剤を宿主に投与するステップを備える。もう1つの具体例において、診断薬は、

凝固産物フィブリンは、この方法のための特に好ましい標的である。血管において内皮下区分に分配され、かつ構造的な異常または透過性の変化により明らかにされるフィブロンекチンは、この方法のためのもう1つの注目される標的である。

この発明により提案されるもう1つの具体例は、腫瘍に対する特異性を備えるmAbへの血管作動成分の化学的結合である。この例において、mAbは、腫瘍内で腫瘍細胞と結合する間または結合した後、腫瘍の部位に血管作動性成分を配置するように働くであろう。次に、血管作動性成分は、mAb結合の隣接領域において周囲の血管に作用するであろう。

この発明により提案されるもう1つの具体例は、分子レベルにおいて、すなわち、生体に導入されるべき「カセット」の構築による血管作動性薬剤への配送媒体の結合であり、前記カセットは、最小限で、配送媒体および血管作動性ペプチドをコードする遺伝子を含む。もう1つの具体例においては、カセットは、制御配列も含むことができるであろう。カセットは、生体のゲノム、プラスミド、または、たとえばウイルスもしくはレトロウイルスのようなベクター中に挿入することができるであろう。

さらにこの発明は、腫瘍の脈管構造または新しい腫瘍の脈管構造と競合する「漏れやすい」脈管構造に対する少なくとも3つの抗原標識を開示し、かつ腫瘍部位、炎症を起

腫瘍組織部位に集中することができる能力を有する、腫瘍の像を造る薬剤と接合された配送媒体を含む接合体として投与される。

この発明のもう1つの局面に従って、腫瘍もしくは構造的に異常な血管の付近、新しい脈管、または腫瘍部位において炎症を起こした血管に集中することができる能力を有するモノクローナル抗体を備える免疫接合体が提供され、これらの接合体は選択された血管作動物質をさらに含む。1つの好ましい具体例において、モノクローナル抗体は、腫瘍において見られるような炎症性の脈管および構造的に異常な脈管の中で循環する抗体に近づくようになる血管壁の内皮下の成分に対して特異性を有する。そのような標的抗原はフィブロンекチン、ラミニン(laminin)およびIV型コラーゲンを含む。もう1つの具体例において、抗体は、血管壁、炎症を起こした血管のすぐ近くの種類、または腫瘍の壊死領域において、活性化される凝固カスケードの成分とともに特異性を有する。そのような抗原は、フィブリン、トロンビン、および補体系の成分を含む、かつ抗体はこれらの特異性に対して有効である。さらにもう1つの具体例は、正常な脈管でなく、炎症を起こした血管における内皮細胞で選択的に発現される抗原に対して特異性を備える抗体を用いるであろう。そのような抗原は、炎症を起こした血管壁への多形核白血球の付着の原因として同定されてきた種々の細胞付着分子を含むであろう。血液

こした組織、腫瘍、および「漏れやすい」脈管を含む同様の部位への特異的な局在化が可能な配送媒体を構成するために同じものを使用する手段を提案する。

したがって、この発明の一局面に従って、腫瘍組織の部位に集中することができる能力を有するモノクローナル抗体(mAb)、およびそれに結合された血管作動性の薬剤を備える免疫接合体が提供される。好ましい具体例において、mAbは腫瘍細胞に対する特異性を有し、かつ特に好ましい具体例において、mAbはB細胞の腫瘍細胞に結合された抗原に対する特異性を有する。この具体例に従って、モノクローナル抗体は $\gamma$ m-1または $\gamma$ m-2であり得る。

一具体例に従って、血管作動性薬剤はペプチドを備え、かつ好ましい具体例においてこのペプチドはタキキニンである。特に好ましい具体例において、タキキニンはフィロメダシン(phyllomedusin)、フィザレミン(physalaemin)およびサブスタンスPからなる群から選択される。

もう1つの好ましい具体例に従って、血管作動性ペプチドはロイコトリエンを含む。特に好ましい具体例において、ロイコトリエンはB4、C4、D4、およびE4からなる群から選択される。

もう1つの好ましい具体例に従って、血管作動性ペプチドはアナフィラトキシンを含む。特に好ましい具体例にお

いて、アナフィラトキシンはC3aおよびC5aからなる群から選択される。

さらにもう1つの具体例に従って、血管作動性ペプチドはリンフォカインである。特に好ましい具体例において、リンフォカインはインターロイキン-1、インターロイキン-2および腫瘍壊死因子からなる群から選択される。

もう1つの好ましい具体例において、血管作動性ペプチドは癌化因子ECF-Aである。

さらにもう1つの好ましい具体例において、血管作動性ペプチドは炎症性物質である。特に好ましい具体例において、炎症性物質はマストパラン(mastoparan)およびベスタチン(beshtatin)からなる群から選択される。

さらにもう1つの好ましい具体例において、血管作動性ペプチドはプロテアーゼである。特に好ましい具体例において、プロテアーゼはトリプシン、キマーゼ(chymase)およびトロンビンからなる群から選択される。

さらにもう1つの好ましい具体例において、血管作動性薬剤は血管作動性炭水化物である。特に好ましい具体例において、炭水化物はグルカンおよびプロテオグルカンからなる群から選択される。

さらにもう1つの好ましい具体例において、血管作動性薬剤は脂質である。特に好ましい具体例において、脂質は血小板活性化因子およびプロスタグランジンからなる群から

選択される。代替的に、脂質は薬剤、ピプロストール(Viprostol)として誘導され得る。

この発明のもう1つの具体例において、血管作動性薬剤は生物学的アミンである。特に好ましい具体例において、アミンはヒスタミンである。

この発明のもう1つの局面に従って、免疫接合体のmAbは無傷の免疫グロブリンであり得る。好ましい具体例において、mAbは一価のHLアイソフォームからなる免疫グロブリンフラグメントであり得る。もう1つの好ましい具体例において、mAbはFc部が切除されたものの1つである。特に好ましい具体例において、mAbはF(ab')<sub>2</sub>部の形態である。

この発明のもう1つの局面に従って、腫瘍を治療するための方法が提供され、その方法は腫瘍の宿主に血管作動性の免疫接合体を投与するステップ、そこにおいて免疫接合体は腫瘍組織の部位に集中する能力を有しているmAbまたはその他の配達媒体を有し、免疫接合体を腫瘍組織に結合させかつ免疫接合体の血管作動性効果を起こさせるステップ、および、それと同時にまたはその後において腫瘍の宿主に治療薬を投与するステップを備える。好ましい実施例において、投与される治療薬は細胞障害性の化学剤である。特に好ましい具体例において、投与される治療薬は細胞障害性の免疫学的薬剤である。

もう1つの具体例において腫瘍を診断するための方法が

提供され、その方法は、腫瘍の宿主に血管作動性の免疫接合体を投与するステップ、そこにおいて免疫接合体は腫瘍組織の部位に集中する能力を有するmAbを備え、腫瘍組織に免疫接合体を結合させかつ免疫接合体の血管作動効果を起こさせるステップ、およびそれと同時にまたはその後宿主に免疫診断薬を投与するステップを備える。

さらに、この発明のもう1つの局面に従って、腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体、および配達媒体に結合された薬剤を備える接合体が提供され、上記薬剤は腫瘍組織に対して組織への血液供給を増加することにより、異なる抗腫瘍剤の作用を増強するよう働く。もう1つの具体例は、正常で健康な血管内皮を透過することができず、一方、腫瘍組織の血管内皮を透過することができるために十分な大きさの接合体を提案する。

もう1つの具体例において、薬剤は、血管内皮の活性部位で血管透過性を増加するように働き、一方、この発明のさらにもう1つの具体例は、上記薬剤が血管内皮の活性部位で局所的な炎症反応を刺激または激化するよう働くことを提案する。

開示される発明の種々の具体例において、上記薬剤は、たとえば、薬物、血管作動性ペプチド、生物学的アミン、または製薬化合物を含むことができる。同様に、接合体は、たとえば、グルカンまたはプロテオグルカンのような炭水化物を含むことができ、あるいは、それは血小板活性化因

子またはプロスタグランジンのような脂質を含むことができる。

この発明のもう1つの局面は、損傷を受け、炎症が起こり、または構造的に異常な血管の内皮において選択的に発現される分子に対して特異性を有する配達媒体を提供する。好ましい配達媒体は、限定されることなく、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)、もしくは免疫グロブリン分子のHLフラグメント、デキストラン、モノクローナル抗体、またはリボソームを含む。特に好ましい具体例において、リボソームは80nmのオーダーの直径を有し、かつデキストランは高分子量のデキストラン(70-150KD)である。さらにより好ましい具体例において、デキストランは透過性の血管壁において選択的に局在化する。

もう1つの具体例において、腫瘍に見られるような炎症を起こした尿管および構造的に異常な尿管において循環する抗体に近付きやすくなる血管壁の内皮下成分に対して、配達媒体は特異性を有する。提案される成分は、限定されずに、フィブロネクチン、ラミニンおよびI型コラーゲンを含む。

さらなる具体例は、血管壁、炎症を起こした血管のすぐ周囲の環境、または腫瘍の壊死領域において活性化される凝固カスケードの成分に対して特異性を有する配達媒体を開示する。もう1つの好ましい具体例において、この成分はフィブリン、トロンビンおよび補体系の成分を含む。

さらにもう1つの具体例において、配達媒体は、腫瘍の付近には認められ、炎症を起こしていない血管組織には認められないような炎症を起こした血管組織の内皮細胞中または上に選択的に発現される抗原に対して特異性を有する。この発明により提案される抗原は、炎症を起こした血管組織への多形核白血球の付着を引き起こすことができる細胞付着分子、フィブリン、フィブロンectin、フィブリン凝成産物、細胞酵素、血小板、および血小板産物を含む。さらなる具体例において、酵素はパーオキシダーゼまたは壊死もしくは炎症を起こした組織において放出される他のタンパク質を含む。

また、この発明は、腫瘍組織の治療または診断のための方法を提案し、その方法は、腫瘍組織の部位に、その部位への血液供給を増加させることによりその組織に対する異なる抗腫瘍剤の作用を強化するように働く薬剤と接合されている抗体を集中させる能力を有する効果的な量の配達媒体を宿主の組織に投与するステップ、および治療または診断のための薬剤に接合された、組織の部位に集中する能力を有する配達媒体を備える、第2の接合体を宿主に同時にまたは後に投与するステップを含む。

もう1つの具体例は、腫瘍組織の免疫治療のための方法を提案し、その方法は、ここに示された接合体の有効な量を腫瘍の宿主に投与するステップ、およびそれと同時にまたはその後に、その組織の部位に集中する能力を有し、かつ

その治療に向けられる配達媒体を腫瘍の宿主に投与するステップを備える。さらなる具体例は、殺腫瘍剤の配達媒体への接合を開示する。

さらにもう1つの具体例は、腫瘍組織の免疫治療のための方法を提案し、その方法は、ここに示された接合体の有効な量を宿主の組織に投与するステップ、およびそれと同時にまたはその後にその組織の治療に向けられる薬剤を宿主に投与するステップを備える。

さらなる具体例において、腫瘍組織の免疫診断のための方法が開示され、前記方法は、ここに示された接合体の効果的な量を宿主の組織に投与するステップ、およびそれと同時にまたはその後にその組織の部位に集中する能力およびそこに結合された検出可能な試薬を有する配達媒体を備える第2の接合体を宿主に投与するステップを備える。

もう1つの具体例は、炎症を起こした組織の免疫治療のための方法を開示し、その方法は、ここに示された接合体の効果的な量を腫瘍の宿主に投与するステップ、およびそれと同時にまたはその後にその組織の部位に集中する能力を有し、かつその治療に向けられた第2の配達媒体を腫瘍宿主に投与するステップを含む。

炎症を起こした組織の免疫治療のための方法がさらにここに開示され、その方法は、ここに示された接合体の有効な量を宿主の組織に投与するステップ、およびそれと同時にまたはその後にその組織の治療に向けられた薬剤を宿主に

投与するステップを備える。

この発明のもう1つの局面は、薬剤として使用のために接合体を構成するための方法を提示し、その方法は、腫瘍細胞の部位に集中する能力を有する配達媒体またはそれと同じものをコードするヌクレオチドを、腫瘍組織への血液の供給を増強するよう働く少なくとも1つの薬剤またはそれと同じものをコードするヌクレオチドに付加することを含む。この発明はさらに、治療用のキットを提示し、そのキットは、腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体、および腫瘍組織への血液供給を増強するよう働く、配達媒体に結合された薬剤、ならびに抗腫瘍性の治療薬を含む接合体を備える。加えて、この発明は、診断用キットを開示し、そのキットは、腫瘍組織の部位に集中する能力を有する配達媒体、および腫瘍組織への血液の供給を増強するよう働く、配達媒体に結合された薬剤、ならびに腫瘍造影剤を含む接合体を備える。

最後に、この具体例のもう1つの具体例は、遺伝子を構成する接合体のための方法を提示し、その方法は、少なくとも1つの薬剤またはそれと同じものをコードするヌクレオチドを少なくとも1つの配達媒体またはそれと同じものをコードするヌクレオチドに付加することを含む。

この発明のこれらまたはその他の長所および特徴は、以下の記述およびそれに続く請求の範囲からより十分に明らかになるであろう。

#### 詳細な記載

系統だって投与される血管作動性の薬剤は正常な血管においてよりも腫瘍性の血管においてより幅広い変化を引き起こすことが示されている。(たとえば、ケイター (Carter), et al., *Br. Cancer* 20:517 (1966) 参照) この効果はモノクローナル抗体もしくは腫瘍内の異常な血管の血管壁または直接包囲する環境において分子と結び付く他の成分に血管作動性の薬剤を結合することにより最大限にすることが可能である。この応用はこのように先の応用の延長であり、上記に引用したように、そこでは腫瘍に対して特異性を有する抗体は、透過性の変化を誘導する目的で、血管作動性の薬剤に接合された。この応用は透過性の変化が血管壁の構成成分、または直接血管に近い環境における他の分子に対して特異性を有する抗体を利用することによりより効果的に得られることを認める点において異なり、腫瘍細胞に対する抗体の使用の代替とされ、それは血管から切離されたある程度の範囲でもよく、それゆえ血流内で循環する抗体によって「示される」ものではない。

好ましくは、使用される抗体は次の特異性を有する。第一として、種々の血管作動性の薬剤との化学的な接合に続いて、それらは抗原に結合する能力を保持する。第二として、それらは血液または正常で無傷の非炎症の内皮のいずれの構成要素にも結合しない。第三として、それらは血液



から組織内に正常な血管の内皮を横切って通過する傾向をほとんど示さないかまたは示さない。第四としてそれらは腫瘍内の多くの血管のように、炎症しているまたは構造上異常である血管内に迷入される、または隣接した分子に結合する。最後に、結合した上で、接合した抗体は血管壁における活性部位に直接に血管作動性の化合物を配達する。爆発的な透過性の変化はさらに部位におけるモノクローナル抗体に結びつけるのに有効に働き、それにより腫瘍血管において生理的な変化が確立されるが、一方で正常な血管は影響されない。

直接に腫瘍血液流におけるこの局在された透過性の変化および/または増加の誘発に続いて、静脈内に注入された薬剤またはモノクローナル抗体のような可能な治療薬は異常に透過性のある部位において血液から組織液への選択的な通過を示す。この機構により、腫瘍部位に配達される薬剤の投与量のパーセンテージはここに記述されるべき研究において2〜6倍に増加されている。この方法は、腫瘍部位に、モノクローナル抗体、または薬剤、毒素もしくは放射性同位体を伴うモノクローナル抗体の接合体のいずれかの薬剤での制ガン剤の配達を改良するために利用されてもよい。

代替的に、透過性の血管壁において選択的に局在する高分子量デキストラン（いわゆる70〜150キログラムトン、KD）のような他の成分は血管作動性の薬剤のための配達

媒体としてモノクローナル抗体の代わりに使用されてもよい。（たとえば、ドボラク（Dvorak）, et al., Am. J. Pathol. 133:95-109（1988）参照）さらに例として、約80ナノメートル（nm）の直径を有するリポソームは腫瘍の透過性の血管壁を横切って選択的な通過を示すものとして開示され、かつまたリポソームは透過性-増強された治療に対して配達媒体として使用されてもよい。（ガン治療において薬剤媒体としてリポソームの使用の議論に対しては、バインスタイン（Weinstein）, J. N., Cancer Treatment Rep 68:127-134（1984）参照）

同様の考えが、1）改良された放射性画像診断を手に入れるという目的に対して腫瘍部位への抗体-同位体接合体の配達、2）患者への全体的投与量を増加することなしに生体に近接して薬剤の濃度を増加するために、炎症性の薬剤により起こした炎症の部位への抗微生物剤の配達、および3）炎症の有毒な効果を抑制する目的で、生体を通じて急性的または慢性的炎症の部位への種々の抗炎症性薬剤の配達に適用される。各事例において、指示された治療薬のI. V. 投与は抗体-血管作動性の薬剤接合体のI. V. 注入により開始され、治療薬の作用の要求される部位の一時的な透過性の増進を作出することがデザインされる。

さらに具体例では腫瘍または炎症した組織における壊死

性部分内の構造に異常な血管における血流に晒されている高分子にはモノクローナル抗体を使用している。このような抗原はフィブリン凝成産物、または壊死性のまたは炎症性の組織において顆粒細胞または他の細胞により放出されたペルオキシターゼのような種々の細胞酵素を含む。

抗体への結合のための種々の血管作動性の化合物は以下に記述した化合物に類似であり、かつペプチド、炭水化物、脂質およびそれらの誘導体を含む。

もう1つの具体例は炎症した血管における内皮細胞上で選択的に放出される抗原に対して特異性を有する抗体を使用している、しかし正常な血管においてではない。このような抗原は炎症した血管壁への多形核白血球の付着に対し原因があると認められてきた種々の細胞付着分子を含んでいる。血管凝固生成物フィブリンは特にこのアプローチに対して惹かれた標的である。フィブリンは正常には血流内に存在せず、循環する前駆物質分子、フィブリノーゲンとしてのみ存在し、それは約340キログラムトン（KD）の分子量を有する。同様に、フィブリンは正常な組織または組織液には存在しない、なぜならその高分子量が正常で無傷な内皮を横切って血液からの逸脱を不可能にするからである。

内皮の損傷または増加した透過性の存在下では、しかしながら、フィブリノーゲンは、尿管内の血餅形成のしくみの活性化を通じて急速にフィブリンに転換されるような組

織に逸脱することができる。このようにフィブリン沈澱は透過性の変化の部位において形成される。腫瘍では、フィブリンの微量沈澱は特に毛細管の断片および完全な内皮の内層を欠く血液チャンネルの近傍に存在する。

さらに、フィブリノーゲンはその分子量特性により血管性漏出のマーカーとして役立つ。第二として、その検出は血管からの逸脱において直ちに不溶性生成物への転換によって容易なものとされる。フィブリンに対してむけられたモノクローナル抗体（フィブリノーゲンと非-反応性である）はそれゆえフィブリノーゲン漏出およびフィブリン沈澱により「標識された」透過性のある血管に選択的に得ることを示すであろう。

フィブロネクチン、これは血管における内皮下の区分に分配されかつ構造上の異常または透過性の変化により明らかにされ、このアプローチに対して重点的に取扱われるもう一つの標的である。（たとえば、クリステンセン（Christensen）, et al., Cancer 1988; ドボラク（Dvorak）, et al., N EJM 315:1650（1986）; およびジェイン（Jain）, Cancer Res. 48:2641（1988）参照）血管作動性の接合体の他の具体化例はまた、他の薬剤または分子と同様に、血管外の浸透またはモノクローナル抗体の結合を改良するものを含んで、有効性を示してもよい。巨大分子が使用されるときここに開

示された複合体が有効であることが示されたのと同様、化学的治療薬剤のようなより小さい分子もまた浸透および結合を増加させることを示してもよい。

モノクローナル抗体より他の媒体を使用する具体化例では、高分子(分子量範囲: 70,000-1,000,000またはそれ以上)もしくはリポソームを含み、生体-化学的な特性に基づいて透過性のある血管に局在する約80ナノメートル(nm)の直径を有する微粒子を使用する。一例では、デキストラン(分子量150KD)は血管作動性薬剤と複合されかつ最低限の透過性の変化を示す血管に生物学的に活性のある分子を配達する役目を果たし、それゆえ部位にのみにおいて著しく透過性を高める。結果として、その後投与された治療のモダリティ(modality)は最初の部位における投与量のより高い割合を示す。

発明の免疫複合体は遺伝的アプローチにより、または共有結合的にないし、炎症を刺激するあるいは好ましくは血管作動性である、生物学的に選択される活性化剤へ臨床的に選択される有効なモノクローナル抗体を連結する他の方法により用意される。免疫複合体を組立てる結合剤および化学的手段は標的細胞に結合する抗体の有効性または天然の防御機構を刺激する際の血管作動性薬剤の有効性を損なわないように選択されかつ遂行されるべきである。

#### 配達媒体の選択

キット(Prep kit)(Bethesda Research Labs, Bethesda, MD)のようなキット(kit)の教示に従って、P3X63-Ag8.653(American Type Culture Collector, Rockwell, MD)のような、非-分泌であるマウスミエロマ融合系統からの細胞と融合される。融合されたハイブリドーマ細胞はその後マイクロタイプレートのウェル(Wells)に移植され、そこでそれらは数日間生育される。ウェル(Wells)における上清は、たとえば、ELISAのような簡便なイムノアッセイにより腫瘍または細胞抗原へのモノクローナル抗体の生成のために試験され、かつ陽性のハイブリドーマ細胞系統、すなわち、受容可能なモノクローナル抗体を作出するものは永久培養へと展開される。モノクローナル抗体は、たとえば、アフィニティーゲル(Affigel)Aカラム(column)(Bio-Rad, Richmond, CA)を使用するように、ゲルクロマトグラフィーによりこれらの培養物の上清から精製されてもよい。

発明の好ましい具体化例では、リンパ腫細胞に対して特異的で商業的に利用可能なモノクローナル抗体、Lym-1およびLym-2が使用される。(Techniclone International, Inc., Tustin, California)

生体内での使用に対する腫瘍-特異的モノクローナル抗

#### 1. モノクローナル抗体

発明における使用に対して最適なモノクローナル抗体は腫瘍細胞に特有の抗原に対して特異性を有するものだけでなく、正常な組織の抗原に対して共有される特異性を有するものも含む。必須の特性は、これらのモノクローナル抗体が腫瘍部位において血管作動性の薬剤を選択的に集中する担体として、発明の目的に従って効果的であるということである。適切なモノクローナル抗体は細胞間の物質のように、抗原への特異性を有するものであってもよく、それらは正常な組織においてよりも腫瘍細胞においてより大量にまたはより容易に結合される。一例は、米国特許No. 4,881,581に開示されるように、核の抗原への抗体である。

腫瘍または正常な細胞抗原に対するいくつかのモノクローナル抗体は、発明の免疫複合体における使用に最適であり、商業的に利用可能である。(Centocor, Malvern, PA; Hybritech, San Diego, CA) それ以外のものはコウレル(Kohler)およびミルスタイン(Milstein)のよく確立されたハイブリドーマ法に従って用意されてもよく、(Nature 256, 495 (1975)) かつ商業的キット(Kits)はこの過程を容易にする。ハイブリドーマ細胞系統を用意するためには、腫瘍抗原を有する免疫されたマウスからの脾臓細胞は、たとえば、HyBRLeブレイブ

体の適合性は、生体分配、細胞局在化、選択的結合、および腫瘍宿主からのクリアランスの割合、または腫瘍宿主の動物モデルにより決定付けられる。組立てられた免疫複合体の作用はまた平行研究によっても決定付けられる。この適合性を評価するための研究は、たとえば、放射性ヨウ素で標識された<sup>131</sup>I-モノクローナル抗体(<sup>131</sup>I-mAbs)のようにラベルされたモノクローナル抗体の手段により、またマクファーレン, A. (McFarlane, A., Biochem. J. 62: 135-143 (1956))の修飾されたクロラミン-T法により簡便に行なわれる。

放射性同位体でラベルされた抗-腫瘍モノクローナル抗体の免疫反応性はLym-1およびLym-2モノクローナル抗体に対する例1において記述されるような試験管内の正細胞ラジオイムノアッセイ法により決定付けられてよい。(エプスタン(Epstein), A. et al., 悪性リンパ腫およびホジキン病: 実験的および治療的進歩(Malignant Lymphomas and Hodgkin's Disease: Experimental and Therapeutic Advances, ) Martinus Nijhoff Publ. Co., Boston (1985), pp. 569-577)

生体内における抗-腫瘍モノクローナル抗体の有効性は、ラベルされたモノクローナル抗体を、腫瘍を有する宿主に

注入した後に続いて行なわれる適切な放射性画像診断、生体分配、組織学的な研究、およびオートラジオグラフィック法により評価されてもよい。

腫瘍部位において選択的に集中するモノクローナル抗体の能力は、放射性画像診断により決定される。後方ガンマシンチレーション画像(100, 000 cpm)は、ピンホール絞りを有するガンマシンチレーションカメラを使用して、放射性同位体でラベルされたモノクローナル抗体の注入後1日おきごとに麻酔された宿主から得られる。できることならばカメラはコンピュータシステムにインターフェイスされているとよい。同じ活性を有する適切な<sup>111</sup>I標準物質がデータを定量化するためカウントされる。

最適な時期に、画像診断研究により示されるので、宿主動物はと殺されかつ血液、主要な器官および腫瘍組織が切取られ、重さを計られ、かつモノクローナル抗体の生体分配を決定するためにカウントされる。さらに、腫瘍組織は固定されかつ包埋されてもよく、かつ組織切片は、腫瘍に結合された放射線同位体でラベルされたモノクローナル抗体を決定するためオートラジオグラフィによって調査される。

免疫複合体のモノクローナル抗体は無傷の全抗体、一価のHLアイソフォーム(HL isoform)、抗体のF(ab')<sub>2</sub>部位、またはFab抗体フラグメントのいずれであってもよい。抗体分子のFc部位の全体または部

分の除去は、無傷で部位に結合する抗原を除去すると同時にFc受容体または補体と同様に非一腫瘍性の構成要素と相互に作用する部位または領域を取除くことによりその使用を容易にする。Fab、HLおよびF(ab')<sub>2</sub>のような抗体フラグメントは、それぞれ全抗体の1/3、1/2および2/3の質量を有し、毛細血管壁を通り抜けるための能力を有しかつより急速に間質組織を通って拡散するので腫瘍内により急速に拡散することができる。しかし一方で、Fab、HL、およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントはより急速に循環から排除される。ウィルボーン(Wilbourn et al., *Cancer* 48:1768-1775 (1981))は、器官に対して腫瘍がFabフラグメントと結合する割合がより高くなり、しかし全抗体を有する腫瘍においては絶対濃度が3倍より高くなることを見出した。モノクローナル抗-ガン胎児性抗原(CEA)を用いた研究において、ワール(Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983))は、F(ab')<sub>2</sub>がフラグメントが急速に排除されたFabフラグメントおよび緩慢に排除された全抗体との最も好ましい中間物であることを見出した。Fabフラグメントはパパインによる全抗体の消化、またはペプシンによるF(ab')<sub>2</sub>フラグメントへの全抗体の消化により用意されてもよく、一価のフラグメントを産出するため分子間ジスルフィド結合の消化により与えられ

てもよい。(ポーター(Porter), R., *Biochem. J.* 73:119 (1959)参照)HLフラグメントは*Nature* 194:355 (1962)または*PNAS (USA)* 50:314-321 (1963)においてすでに示された技術に従って調製されてもよい。

## 2. 高分子または巨大粒子

リポソームおよびデキストランのような高分子は、実験モデルにおいて放射性画像診断により見付けられるように、腫瘍に局在する能力に基づいて選択される。使用される方法はモノクローナル抗体に対して上記に記述した方法に類似する。

### 血管作動性の薬剤の選択

この発明の血管作動性の免疫複合体はそれらの作用の様式において薬剤または毒素複合体から区別される。薬剤および毒素複合体は直接的に腫瘍細胞を殺すのに使用される。血管作動性の複合体は、血管外の浸透ならびにモノクローナル抗体および他の薬剤または生体内の分子との結合を改良するため、血液の流れおよび/または腫瘍における血管透過性を増加するために使用される。それらは直接的に腫瘍血液流の体積または腫瘍血管の「漏れやすさ」の程度を増大することにより、もしくは間接的に腫瘍部位における炎症の免疫反応を引き起こすことにより作用する。炎症は、多形核白血球、マクロファージ、好酸性白血球、好塩基性白血球、肥満細胞、T細胞および炎症に関連のある他の

細胞を引き寄せる化学性因子により起こされることが可能である。これらの細胞は刺激されると免疫活性調節因子を分泌し、それらは腫瘍へ浸透しかつ結合する注入された投与量のパーセンテージを増大するため腫瘍血液流および血管透過性に作用する。

腫瘍部位において記述した反応性を有しかつ免疫複合体においてモノクローナル抗体に接合するのに通じている血管作動性の薬剤は、ペプチド、炭水化物、および脂質ならびにそれらの誘導体を含んでいて、いくつかの生化学種において見出される。

天然の、合成の、または組換体のいずれのペプチドも、免疫複合体における使用に適合する血管作動性の薬剤の最も豊富な源を含む。

タキキニン(デカ(decar)、エンセダ(encedar)、およびドデカ(dodecar)ペプチドアミド族であり、COOH末端から5の位置に1つのフェニルアラニン(Phe)残基を有する。それらは血圧、心血管性の平滑筋、および外分泌腺において効果的な薬物的効力を有する。(エルスパメル(Erspamer), V., *TINS*, Nov. 1981, pp. 267-269)サブスタンスP、哺乳類のタキキニンは、化学的感受性の神経繊維の逆行性の刺激を通じて血管拡張およびプラズマ血管外遊出を促進する。(ラムベック(Lambek), F. and ハルツェル(Halzer), P., *Nau*

nyn-Schmeideberg' s Arch. Pharmacol., 310: 175-183 (1979)) サブスタンス-Pはまた組織肥満細胞からヒスタミンの放出を仲介する。(ハゲルマルク (Hagermark), O. et al., J. Invert. Dermatol., 71: 233-235 (1978)) 発明の好ましい具体化例では、サブスタンス-Pおよび両生類の類似体、フィザレミンは腫瘍血管構造の拡張を促進するのに使用するため臨床的に有効なモノクローナル抗体に接合される。

ロイコトリエンはアトピー性アレルギーにおいて抗力のある媒介物質であるスルフィドペプチドである。臨床の症状発現および疾患の身体的な特徴は、炎症作用に関連を有する血管におけるこれらの媒介物質の作用が原因である。1 nmolのロイコトリエンC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>またはE<sub>4</sub>でも紅斑およびじんま疹形成を引起す。発明の好ましい具体化例において、ロイコトリエンB<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>またはE<sub>4</sub>は腫瘍部位において局所的炎症反応をもたらすのに使用するため臨床的に有効なモノクローナル抗体に接合される。

アナフィラトキシンは血清補体の活性化の間に放出されたペプチドフラグメントである。補体プロテインC3およびC5の酵素的開裂は、それぞれ活性化ペプチドC3aおよびC5aを放出する。これらのペプチドはアナフィラキシックに似た反応を作出する能力のためアナフィラトキシンと称されてきた。C3aおよびC5aは血管性の

341-355 (1984) 参照)

IL-2は免疫接合体への使用に対して特に重要である。このリンフォカインはそれ自体に抗腫瘍活性を持たないが、リンフォカイン活性化されたキラー(LAK)とともに投与されるとき、抗力のある活性を有するようである。抗腫瘍剤としての使用は限定されるようである、なぜなら宿主の血管性の透過性および血管外遊出を仲介する能力は体液保持のため腫瘍部位効果をもたらすためである。(フェアマン(Fairman), R. et al., Cancer Res., 47: 3528-3532 (1987); Rosenstein et al., J. Immunol., 137: 1735-1742 (1986) 参照) しかしながら、IL-2の血管作動性の特性はこの発明の免疫接合体としての使用によく適応している。IL-1がリンパ球からのIL-2の作出を刺激し、かつTNFが他のリンフォカインと接合して共力的な特性を備わせるようなので、リンフォカインの免疫接合体はIL-2の免疫接合体と協力して有用となる。(タルマジ(Talmadge) et al., Cancer Res., 47: 2563-2570 (1987); フィリップ(Phillip), R. and エプスタイン(Epstein), L., Nature 323, Sept. 4, pp. 86-89 (1986) 参照)

C3aアナフィラトキシンの場合には、インターロイキ

ン透過性を増大し、かつ組織肥満細胞からセロトニンおよびヒスタミンを含む顆粒を放出する能力を有する。加えてかつおそらくC3aと協力して、C5aは走化性であり、好中球の遊走および凝集を引起す。(ナガタ(Nagata), S. et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immun., 82: 4-9 (1987) 参照) 発明の好ましい具体化例では、C3a, C5aまたはそれらの生物学的に活性のあるペプチド配列は、単独または組合わせのいずれでも、腫瘍-特異的なモノクローナル抗体に接合され、モノクローナル抗体の血管外の透過性を促進するための新たなアプローチとして、腫瘍部位において局在された炎症の反応を引起すために使用される。

これらのペプチドの生物学的な活性は、合成のオリゴペプチド、長さにして8から21アミノ酸、COOH末端において本来のC3の共通の残基を含んでいるものにより再生産される。(たとえば、ハグリ(Hugli), T. and エリクソン(Erickson), B., PNAS USA 74: 1826-1830 (1977) 参照)

インターロイキンIL-1およびIL-2ならびに腫瘍ネクロシス因子(TNF)を含むリンフォカインは外的な作動物質に対して生物の防御における複雑な役割において作用しかつ相互作用する免疫反応の内因性の刺激物質である。(たとえば、カンシュミット(Kampschmidt), R., J. Leukocyte Biol., 36:

ンの機能的領域を含む小合成オリゴペプチドはまた免疫接合体における使用に適している。(たとえば、アントニ(Antoni), G. et al., J. Immunol., 137: 3201-3204 (1986) 参照)

また血管作動性の免疫接合体における使用に適しているペプチドのもう1つのグループは人間の好酸球酸性テトラペプチド(ECF-A)、Val-Gly-Ser-GluおよびAla-Gly-Ser-Gluであり、それらは局所好酸球増加症を促進する能力を化学走性を通じて有する。(ターンボール(Turnball), L. et al., Immunology, 32: 57-63 (1977))

さらに血管作動性の免疫接合体において使用されるとき、ある種のペプチドである炎症物質は腫瘍部位において肥満細胞を脱顆粒化し、ヒスタミンを放出し、かつ局所炎症反応を刺激する能力を有するだろう。このような炎症物質の1つであるマストバランはハチ毒から分離されたテトラデカペプチドである。(オカノ(Okano), Y. et al., Fed. Europ. Biochem. Soc., 188(2): 363-366 (1985)) 好ましい具体例において、天然源から分離されたまたは合成的に作出されたいずれのマストバランでも腫瘍-特異的なモノクローナル抗体(mAb)に結合される。(ヒライ(Hirai), Y. et al., Chem. Pharm. Bull.,

27 (8): 1942-1944 (1979) 参照)

免疫学的活性化において肥満細胞から放出されたプロテアーゼは皮膚における過敏症反応を刺激するようである。これらのプロテアーゼの可能な作用は結果的には血管透過性を増加させかつ二次的炎症細胞の流入を伴う血管基底膜の消化を含む。トリプターゼ、胰臓トリプシンに類似したエンドペプチターゼは、2つの30キログルトンおよび2つの37キログルトン サブユニットから成る四量体である。それらは人間の肺臓肥満細胞の重要なプロテアーゼでありかつあらゆる位置からの肥満細胞においても存在する。人間の皮膚肥満細胞において見出された、キマーゼは胰臓キモトリプシンと同じような特異性を有する。(Serafin, W. and Aurtin, K., NEJM, July 2, pp. 30-34 (1987))。発明の好ましい具体例では、トリプターゼおよびキマーゼは腫瘍部位における局所炎症反応を引き起こす際の使用目的のため腫瘍-特異的モノクローナル抗体 (mAbs) に接合される。

ある脂質化合物は免疫接合体として有効性がありうる。発明の一具体例では血小板-活性化因子 (PAF) は免疫接合体の血管作動性の薬剤である。PAFは免疫反応の抗力のある媒介物質であると思われる人間の肝中球によってもたらされるリン脂質である。(ブラケット (Braquet), P. and Rola-Pleszczysk

: 492-494 (1982) 参照)

免疫刺激作用において放出される肥満細胞顆粒の化合物である、ヒスタミンは、他の効果の中でも、ロイコトリエンとして記述されるような、血管の透過性の増大および血管拡張を引き起こすため、 $H_1$  および  $H_2$  とデザインされた2の形の受容体を通じて作用する。(セラフィン (Serafin), W. and オースチン (Austin), K., NEJM, July 2, pp. 30-34 (1987)) 発明の好ましい具体例では、ヒスタミンは腫瘍部位における局所炎症反応を引き起こすのに使用するため腫瘍-特異的なモノクローナル抗体に接合される。

発明のまた他の具体例では、免疫接合体の効果的な薬剤は血管作動性の炭水化合物化合物である。好ましい具体例では、血管作動性の炭水化合物はグルカンである。グルカンは多くの免疫増強効果を有するサッカロミセス セルビジェ (*Saccharomyces Cerevisiae*) から誘導される  $\beta$ -1, 6 結合されたポリグルコースである。(グロブスキ (Glovsky), M. et al., J. Reticuloendothelial Society, 33: 401-413 (1988)) が、インターロイキン IL-2 とは異なり無毒性である。(シャークウッド (Sherwood), E. et al., J. Biological Response Modifiers 7: 185-198 (1988) 参照) グルカンは植

物、M., Immunology Today, 8 (11): 345-352 (1987)) PAFは、たとえば前に触れた血管作動性のペプチドに関してあらゆる炎症および免疫作用と実質的に結合され、PAFはサブスタンス-Pの放出を刺激し、かつロイコトリエンまたはプロスタグランジンのような他の血管作動性剤の形成を誘導する。免疫接合体におけるその使用は、内生的であろうとまた補足的な免疫接合体として使用されようともこれら他の薬剤の効果を拡大することができる。

発明のまたもう1つの具体例では、血圧降下薬剤、ビプロストール (Viprostol)、プロスタグランジン誘導体 (American Cyanamid, Pearl River, NY) は免疫接合体として活性のある薬剤である。ビプロストールは血管拡張を通じて主に動脈の血圧を低くする。(チャン (Chan), P. et al., J. Hypertension 4 (6): 741-746 (1986) 参照) 腫瘍-特異的で目的にされたビプロストール投与の利用はそこでの血液体積の増大のため腫瘍の腫瘍構造を拡大するだろう。

同様に、他の具体例において、血圧降下の効果を有することが知られている天然のプロスタグランジン、(PGE's)、または合成類似体は効果的に使用されることが可能である。(ビルンボイム (Birnbau) et al., J. Medicinal Chem. 25 (5)

合物システムを刺激し、他の複合物フラグメントのうちでも、血管作動性のC3aおよびC5aペプチドを生成することによりその効果を及ぼすようである。特異的なモノクローナル抗体によって腫瘍へ目標を定められたグルカンは腫瘍血管構造を拡張するためC3aおよびC5aを通じて局部的に作用することが可能である。

接合体分子は治療または研究の定まった目標に対する有効性および適用性によって選択される。

#### 化学的な接合方法

モノクローナル抗体、高分子、または巨大粒子および血管作動性の薬剤との間の構造上の連結ならびにそれらが結合される場合の化学的な方法は、モノクローナル抗体の結合能力および薬剤の生物学的能力が、接合体に接続される時、損失が最小限にされるように選択されるべきである。

最も効果的な接合反応に選ばれた方法は次のようなものである。

a) カルボジイミドは、ウレアの無水物として扱われてもよい。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (ECDI) は、いずれの分子の配向に関係なく、抗体と接合体の間に架橋を生成する。接合体はECDIを伴う酸性状態下で抗体および接合体の結合により誘導される。この方法は接合作用の敏速かつ簡単な1手段階を提供する。(グッドフレンド (Goodfriend), T. et al., Science 144:

1344-1346 (1964) 参照) フェザレミンまたはインターロイキンを  $\text{Lym}-1$  または  $\text{Lym}-2$  に結合するための ECDI の使用は、例 2 および例 7 において例示した。

b) N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) は、プロテインの末端アミノにチオール基を誘導し、かつ多くの免疫接合体において使用されてきたヘテロニ価試薬である。(カールソン (Carlsson), J. et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978))

c) モノクローナル抗体の  $F(ab')_2$  フラグメントに C3a を接合するため SMCC 法の使用は例 3 に例示した。

d) シェンら (Shen, et al.) より記述されるシス-アコニチン結合は、二次リソソームにおいて次の受容体-結合抗体分子のエンドサイトーシスのように、低い pH において接合体を放出するような性質を有する。その方法は抗体分子の炭水化物部位基への接合を与える。(シェン (Shen), W.-C., および ライセル (Ryser), H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 102 (3): 1048-1054 (1981)) モノクローナル抗体に薬剤ビプロスタール (Viprostal) を接合するためシス-アコニチン誘導体化の使用は例 4 に例示した。

それらが生体内で応用される前に、免疫接合体は生成物により維持される免疫再活性および生物学的活性の程度を決定付けるため (ビンドンら (Bindon et al.), Br. J. Cancer, 47: 123-133 (1983)) によって記述された増殖放射性免疫反応測定法により試験管内で評価され、かつ例 8 において例示される。非接合型の抗体に比較して 80% 以上の免疫再活性を有するとみなされる免疫接合体のみが生体実験に使用される。

好結果の免疫接合体はモノクローナル抗体を基にした診断および治療における臨床での有効性を最大にするであろう。臨床的には、血管作動性の免疫接合体が免疫診断、化学治療法または免疫治療法投与に先立ってまたは同時に与えられることで、腫瘍の尿管構造は効果的な薬剤により、より浸透されやすくなされるであろう。最大の血管作動性効果を引き出すのに必要とされる時間は選択される特異的な接合体およびその作用機構によって異なる。もしモノクローナル抗体が投与されるのに先立って与えられるなら、血管作動性の免疫接合体の投与と診断薬および治療薬の投与との間の最小時間は少なくとも約 20 分はかかり、かつ最長時間では約 72 時間もかかることは予想される。血管作動性の免疫接合体を投与する時間と投与との間の適切な間隔は、動物実験または上記に記述した画像診断、生体分配研究、および組織的な方法を用いて標識された免疫接合体を使用して腫瘍宿主に関する適切な研究により、経験的に決

e) 過ヨウ素酸酸化は糖環における炭素-炭素結合を酸化しかつ裂開するのに使用できる。さらにむき出しの末端基は  $\text{NaBH}_4$  で還元されたシッフ塩基結合でプロテイン上の  $\text{NH}_2$  基と結合することができる。(キタオ (Kitao), T. and ハットリ (Hattori), K., Nature, 265, January 6, pp. 81-82 (1977)) モノクローナル抗体ヘグルカンを接合するための過ヨウ素酸酸化の使用は例 5 に例示した。

f) N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) はモノクローナル抗体のプロテインに共有結合されることが可能な活性エステル誘導体を形成するため、たとえばペプチドの末端  $\text{COOH}$  基を活性化させる。この方法は結合活性をほとんど損失することなくクロランブシル/抗体の 30 個の分子を結付けるのに使用されている。(スミス (Smyth), M. et al., J. Natl. Cancer Inst., 78 (3): 503-510 (1986)) モノクローナル抗体にマストバランを接合するための NHS 法の使用は例 6 に例示した。

#### 血管接合体の構成に対する遺伝子工芸法

モノクローナル抗体に血管作動性の薬剤を化学的結合させる代替的方法として、血管作動性のペプチドの遺伝子配列は例 11 に例示したようにモノクローナル抗体の配列中に設計されることが可能である。

#### 血管作動性の免疫接合体の使用

定されることが可能である。

与えられるべき血管作動性の免疫接合体の投与量は、客観および主観に双方における、医学的判定および経験の分類基準に基づいている。しかしながら、十分な量の効果的な投与量は、治療の臨床上の有効性または診断の正確さを統計的に意味のある程度にまで改善する範囲まで後に投与される診察上のまたは治療上の薬剤の局在化を増進するのに必要とされる総量である。比較は増量の投与量の診察上のまたは治療上の薬剤が投与される治療を受ける腫瘍宿主動物および治療を受けない宿主動物との間で行なわれる。たとえば、正常な組織にとっては毒性があるような診察上のまたは治療上の薬剤の使用において適用可能な場合には、血管作動性の接合体の効果的な投与量はまたこのような毒性効果を同様に減ずるような量となる。

免疫診断上の投与量は、腫瘍に対して特異性を有するあるいは生体内で検出可能である標識を有するモノクローナル抗体を含む。好ましい具体例では、この標識は放射性活性のある同位体を含む。免疫治療上の投与量は臨床的に有用なモノクローナル抗体を同様に含んでもよい。このモノクローナル抗体はさらにたとえば、放射性同位体、化学的治療薬または毒薬のような較腫瘍性の薬剤に結付けられてもよい。

#### 例 1

放射性同位体で標識されたモノクローナル抗体の免疫反

## 応性

ラージ細胞は1mg/mlウシの血清アルブミンおよび0.02%重化ナトリウムを含む冷PBSで2度洗浄される。(ラージ細胞の説明および同じものを得るための方法については、たとえば、J. Nat'l Cancer Inst. 37:547-559 (1966) 参照) 100μlの洗浄バッファー(buffer)において再び懸濁された細胞( $5 \times 10^5$ )はマイクロタイタのウェル(wells)にピペットで注入される。(イムロン レモバウェル ストリップス; ダイナテックラボラトリーズ インコーポレイテッド、アレクサンドリア、VA) (Imulon Removawell Strips; Dynatech Labs., Inc., Alexandria, VA) マイクロタイタプレートは抗体溶液がウェルに結合するのを防ぐためにアジドを含むPBSにつきBSA 10mg/mlで一晩前処理される。(商業的に手に入れることができるLym-1およびLym-2のようなリンパ腫細胞に対して特異的なモノクローナル抗体はテクニクローン インターナショナル インコーポレイテッド (Techniclone International, Inc.) タスチン(Tustin)、カルフォルニア(California)から入手可能である。)放射性同位体で標識されたLym-1およびLym-2はさらに体積100μl/ウェル内に(100,000cpm/ウ

エルで)加えられかつプレートは一定の量とて室温で30分間懸濁される。さらにプレートは5分間の1,000rpm回転でかつ12-チップ・マイクロマティック マニホールド(12-tip micromatic manifold)で上清を吸引しながら4度洗浄され、かつさらにタイターティック マルチチャネル ピペット(フローラボラトリーズ、マククリーン、VA) (Flow Labs, McLean, VA)を使用して200μlの洗浄バッファー内に細胞を再び懸濁する。ウェル(wells)はその後機械的に切り離され、細胞に結合した標識の総量を定量するためガンマーカウンター内で計出される。

## 例2

CDI法によるモノクローナル抗体へのフィザレミンの接合

フィザレミン(シグマケミカルコーポレーション、セントルイス、MO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) はカルボジイミド法によりモノクローナル抗体Lym-1およびLym-2に接合される。フィザレミン、Lym-1またはLym-2、および1-シクロヘキシル-3-(2-メルフォリノエチル-1)カルボジイミドメト-ポートルエンシルホネート(CDI) (アルドリッチケミカルコーポレーション、ミルウォーキー、WI) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) は質量にして1:3.6:3

6の割合で混合されかつ室温でpH5.0で20分間懸濁される。反応はpH7.2で一晩中、PBSに対する透析により終結させられる。接合体はPPLCシューブローズ(Superose) (ファルマシア、ピスカタウェイ、NJ) (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラムクロマトグラフィで精製されかつPBSにおいて4℃で保存される。

## 例3

SMCC法によるF(ab')<sub>2</sub>モノクローナル抗体へのC3αペプチドの接合

C3α(57-77)ペプチドは、二機能性の試薬、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン1-カルボキシレート(succinimidyl-4-(N-maleimido methyl)cyclohexane-1-carboxylate) (SMCC)を使用してF(ab')<sub>2</sub>モノクローナル抗体に結合させられる。(M.ハーマンら(M. Herman, et al.,)「予め決定されている特異性を有する抗ペプチド抗体は全-特異的造血IL-3の生物活性を認識しかつ抗力を失活させる」J. Immunol. 138:1099-1104, (1987))

モノクローナル抗体は、抗体のFc部位により白血球に非-特異的に結合すること为了避免するためペプシンを使用してF(ab')<sub>2</sub>フラグメントに切断される。N-末端シ

ステイン残基を含む、C3α(57から77)はオートメーション化されたプロテイン合成を使用して合成される。C3αペプチド(1mg)はpH7.5で300μlの4Mグアナジニウム-PBS(guanadinium-PBS)に溶解される。pHは約3Lの17% $H_3PO_4$ で3と4の間に透析により調整される。この溶液はレシーピング(receiving)管(17×100mm)に収容される。

F(ab')<sub>2</sub>抗体(60nmole)はpH7.5で1.0ml PBSに溶解されかつジメチルホルムアミド(DMF)に溶解した2400nmole「試薬」(SMCC)と反応させかつ室温で30分間かき混ぜられる。F(ab')<sub>2</sub>混合物はセファデックス(Sephadex) (ファーマシア、ピスカタウェイ、NJ) (Pharmacia, Piscataway, NJ) G-10カラム(2ml)に適用され、1分間1500Gで遠心分離されかつレシーピング(receiving)管に集められる。カラムはpH7.5の300μl PBSで洗浄し、かつ再-遠心分離される。pHは7.0および7.7の間に調整されかつ混合物は室温で3時間かき混ぜられる。

接合された抗体は4℃で保存される。

C5αは二機能性の架橋試薬ジメチルスーパーイミデートまたはSPDPを使用してF(ab')<sub>2</sub>抗体に結合される。条件は1/1 C5α-F(ab')<sub>2</sub>接合体を生成

# 特表平4-503945 (16)

するためかつC5αまたはF(ab')<sub>2</sub>いずれか単独の重合作用を最小限にするために調製されるだろう。

## 例4

シス-アコニチル誘導体化によるモノクローナル抗体へのビプロストール (Viprostol) の接合

ビプロストール (Viprostol) は、11-ヒドロキシ基によってシス-アコニチルのスペーサーアーム (a cis-aconityl spacer arm) を付加することにより誘導化されることができる。この反応において、ビプロストール (Viprostol) (5mg) は試験管内で1mlの0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>に溶解されかつ氷浴で冷却される。モル過剰 (5mg) のシス-アコニチル (cis-aconityl) アンヒドリド (アンドリッチケミカル、ミルウォーキー、WI) (Aldrich Chemicals, Milwaukee, WI) が混ぜながら溶液にゆっくりと加えられ、かつpHは1N NaOHを注意深く加えることにより8と9の間に保たれる。サンプルの薄層クロマトグラフィーは反応の進行をモニターするのに使用される。<sup>3</sup>H-または<sup>14</sup>C-でラベルされたビプロストール (Viprostol) のトレーサー (tracer) は反応混合物に加えられてよく、反応の経過は薄層プレートのオートラジオグラフィーによってモニターされる。誘導体の分離および精製は生成物の酸性化および精製またはカラムクロマトグラフィーを使用

することにより達成されてもよい。モノクローナル抗体にビプロストール (Viprostol) を接合するため、シス-アコニチルビプロストール (cis-aconityl Viprostol) 誘導体はLym-1またはLym-2モノクローナル抗体を含んだ溶液に加えられる。混合物はさらにpH5.0室温で30分間懸濁されてもよい。反応は終了し、かつ接合体はセファデックス (Sephadex) G-25カラムを通じて、またはFPLCシステム-ブローズ (Superose) カラムクロマトグラフィーによってサンプルを分離することにより精製される。

## 例5

過ヨウ素酸酸化によるモノクローナル抗体へのグルカンの接合

グルカンは生物活性に影響することなく、NaIO<sub>4</sub>の1から2モルの過剰のみを使用して、糖部分の1つを切断するため過ヨウ素酸酸化を使用することにより注意深く酸化される。酸化によるグルカン内に生じたアルデヒド基は Schiff 塩基を形成するためモノクローナル抗体上の-NH<sub>2</sub>基に反応するだろう。Schiff 塩基結合はさらにグルカン-モノクローナル抗体接合の安定したアミン結合を形成するため、0.3mg/mlの濃度でNaBH<sub>4</sub>により還元される。

## 例6

NHS法によるモノクローナル抗体のマストバランの接

合

マストバラン (mastoparan) の活性エステルはジメチルホルムアミド (dimethylformamide) におけるN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) による反応および結合試薬としてN, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) を利用した反応によって調製される。DMFにおけるマストバラン (mastoparan) 活性エステルの溶液はさらにpH7.0でLym-1またはLym-2モノクローナル抗体を含む溶液に加えられ、かつ室温で1時間から2時間かけて反応させられる。不溶解の物質、主にジシクロヘキシルウレアおよび/または沈殿したプロテインは遠心分離により除去される。遊離マストバランおよび他の不活性の開始物質はセファデックス (Sephadex) G-25 (ファルマシア、ピスカタウェイ、NJ) (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラムを使用するゲル濾過クロマトグラフィーにより除去されることができる。接合において結合されるマストバランの総量はトリチウム (<sup>3</sup>H) で標識されたマストバランのトレーサーを使って決定される。

## 例7

CDIによる腫瘍-特異的なモノクローナル抗体へのインターロイキン-2の接合

組換え型インターロイキン-2 (rIL-2) (シータスコポーレーション、エメリービル、カルホルニア) (Ce

tus Corporation, Emeryville, California) は0.3mgまたは1.2mg/バイアル (vial) を含むようバイアル (vial) 内に提供される。Lym-1のように精製されたモノクローナル抗体は、pH7.4、リン酸バッファー (buffer) で全体量が0.3mlが与えられるように、rIL-2に、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル) カルボジイミド メト-ポートルエンシルホネート) (「CDI」) およびN-ヒドロキシスルホスクシンイミドを1:2:50:50の質量比で使用して接合される。反応混合物は4℃で一晩中懸濁させる。4℃で15分間4000rpmで遠心分離後、可溶性の結合抗体はブルーデキストランで目盛りづけされたセファデックス (Sephadex) G-100カラムにおいてクロマトグラフィーされる。この方法を使用することでrIL-2の約1-2分子が各モノクローナル抗体 (「mAb」) 分子に結合される。その免疫接合した調合薬剤はさらに1mg/mlに調整され、無菌濾過されかつ使用まで4℃で保存される。この方法はいかなる腫瘍-特異的なモノクローナル抗体にrIL-2を結合するのに使用することができる。

## 例8

治療薬へのインターロイキン-2の接合

上述と同様の接合方法が、腫瘍の内皮に対して特異性を有するモノクローナル抗体にIL-2を結合するために使



用することができる。例として、フィブロネクチンに対するモノクローナル抗体が、正常な内皮と比較して、腫瘍の尿管構造に選択的に結合するため示されてきた。腫瘍部位における rIL-2 の最初の作用が、血管の透過性を促進することであるため、腫瘍内皮への血管作動性免疫複合体の攻撃は最良となるであろう。加えて、同様の方法論を用いて、rIL-2 複合体の治療は、たとえば、異なるタイプの癌の治療のためのシスプラチン (cisplatinum) を含む通常の化学治療剤の使用により補われるかまたは軽減される。

#### 例 9

##### 遺伝子組換え処理した血管作動性免疫複合体

腫瘍または腫瘍の尿管構造を目標とするモノクローナル抗体に血管作動性ペプチドを化学的に結合する代わりに、血管作動性ペプチドの遺伝子配列をモノクローナル抗体の配列に組み込むことができる。例として、抗フィブロネクチンモノクローナル抗体をコードする mRNA が分離される。この mRNA から、免疫グロブリンの H および L 鎖の両方のための cDNA が合成される。この cDNA は、順次、1) ポリメラーゼ連鎖反応を利用して増やされ、2) 配列決定され、かつ 3) 制限エンドヌクレアーゼによりマッピングされる。IL-2 のような血管作動性ペプチドの適切な DNA 配列は、次に、定常部における H 鎖遺伝子の末端に連結される。

プレートウェルに 3 連で培養される。培養物は、時間 2 μCi の  $^{125}$ I-IUDR (New England Nuclear Co., Boston, MA) が 4 時間のインキュベーション期間において添加された後、37℃で 24 時間インキュベートされる。次に、細胞は、γ線カウンタにおいて計数される前に、PBS を用いて 3 回、かつ 5% トリクロロ酢酸を用いて 1 回洗浄されることにより採集される。正のコントロールとして生成された rIL-2 を用いることにより、投与応答曲線を形成するために、 $\log_2$  の rIL-2 希釈に対して  $^{125}$ I-IUDR 取込データをプロットすることができる。50% の最大  $^{125}$ I-IUDR 取込 (y 軸座標) においてこの曲線が交わるコントロール試料の x 軸座標は、rIL-2 活性の 1 ユニットに相当する値として定められる。このようにして、免疫複合体調製物の rIL-2 活性がバッチからバッチまで定量化される。

#### 例 11

##### モノクローナル抗体 Lym-1 による血管外腫瘍の浸透を増加するための血管作動性化合物の使用

生体内の分配における IL-2 血管作動性免疫複合体の相対的な効果およびリンパ腫を保持するヌードマウスに腫瘍の Lym-1 の取込を試験するために、0.5 g ラージ (Raji) リンパ腫の皮下移植片をそれぞれ保持する 5 匹のマウスの群が、50 μCi の  $^{125}$ I-IL-2 で放射性ラ

次に、完全に処理された遺伝子は、遺伝子トランスフェクション法 (たとえば、エレクトロポレーションまたは誘発カルシウム法を用いる) により、真核生物または原核生物の発現系内に導入され、大量の細胞培養においてタンパク質生産物として発現される。第 1 図に示されるように、2 つの活性 IL-2 成分が、それぞれの免疫グロブリン分子の一部となるであろう。それぞれの血管作動性ペプチドに対する最良の付着部位は、異なり得、かつ実験的方法により容易に決定し得る。血管作動性ペプチドの配列は、人、マウス、キメラもしくは他の種の免疫グロブリン分子の組合わせを生産するために、人またはマウスの免疫グロブリンの H 鎖配列に連結される。

#### 例 10

増殖検定により決定された免疫複合体の機能的活性 rIL-2 免疫複合体の機能的活性を試験するために、増殖検定が行なわれる。

新鮮なマウスの脾臓細胞が、PHA により 3 日間刺激された後、rIL-2 とともに 7 日間静置培養される。次に、細胞は洗浄されて rIL-2 が取除かれ、かつ 10% 胎児血清および抗抗体物質が補われた RPMI-1640 培地に再懸濁される。10<sup>5</sup> の細胞を含む 100 μl が、異なる濃度の免疫複合体 (テスト試料)、rIL-2 (正のコントロール) および Lym-1 もしくは Lym-2 (負のコントロール) を 100 μl 存在させたマイクロタイター

ベルされた Lym-1 の F(ab')<sub>2</sub> 20 μg の投与前の 0 時間、または 2 1/2 時間において、血管内に、Lym-1 (コントロール) または Lym-1/IL-2 免疫複合体 (実験) を投与された。3 日の後、すべてのマウスは殺され、かつ腫瘍および正常な器官が組織 1 グラム当たりのラベル量を定量化するために取除かれた。以下に示すように、実験の Lym-1/IL-2 免疫複合体を接種したこれらのマウスは、適切なコントロールに対して mAb の局在化について 200% の増加を示した (第 1 図)。さらに、第 2 図-第 4 図に示されるように、mAb の局在化についてのこの増加は、腫瘍/血液比を約 2 倍高め (第 2 図)、投与量に依存し (血管複合体の 30-50 μg の間において最大の効果; 第 3 図)、かつ mAb の投与前の 2 1/2 時間で最大の効果が示されるように時間依存性 (第 4 図) である。

#### 例 12

##### 臨床的な利用および応用

血管作動性免疫複合体は、1) 薬剤または薬剤を含むリポソーム、および 2) 治療用モノクローナル抗体、の配達を促進するために使用されることが意味される。この免疫複合体の作用機構は、腫瘍部位において透過性および/または血液の流れを増加させることによる。それゆえに、薬剤、モノクローナル抗体、またはリポソームが治療のために投与される 1-3 時間前に、免疫複合体は一般的に投与

される。

動物モデルにおいて、 $[-131 \text{ Lym-1 F(ab)'}_2]$  を投与する2 1/2時間前におけるLym-1に結合されたrIL-2の使用は、コントロールに比べて、後者の投与を200%増加させる。組換えされた免疫複合体の使用は、生体内におけるその効力を顕著に高めるであろう。

この発明は、その思想または本質的な特徴から外れることなく、その他の特定の形態において具体化される。上記具体例は、すべての点で、限定されず例としてのみ考慮されるべきであり、かつ、したがってこの発明の範囲は上記記載よりもむしろ次に掲げられる請求の範囲により示される。請求の範囲と均等な手段および範囲の中にあるいかなる変更もこの発明の範囲内に包含されるべきである。

ラージ-保持ヌードマウスにおける放射能ラベルされたLym-1 F(ab)<sub>2</sub>でウズ取込みに関するLym/IL-2免疫複合体の効果

処 理	処 理 時 間	腫瘍における 投与/gm %
Lym-1 *	0 hr	1.40 ± 0.22
Lym-1/IL-2 **	0 hr	2.43 ± 0.37
Lym-1 *	-2.5 hr	2.80 ± 0.63
Lym-1/IL-2 **	-2.5 hr	5.68 ± 1.22

• = コントロール  
•• = 実験

FIG. 1

リンパ腫-保持ヌードマウスにおけるIL-2とLym-1/IL-2免疫複合体の接合の効果

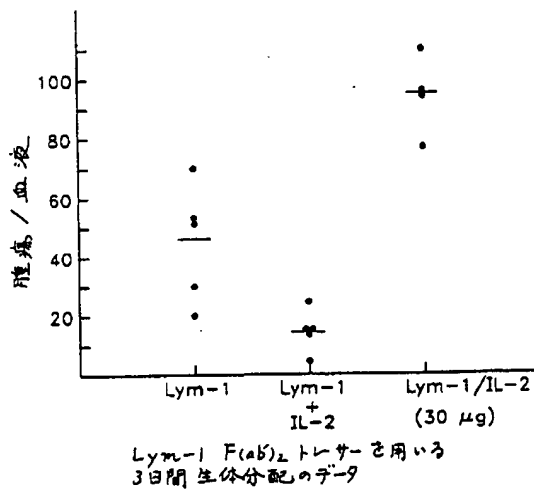


FIG. 2

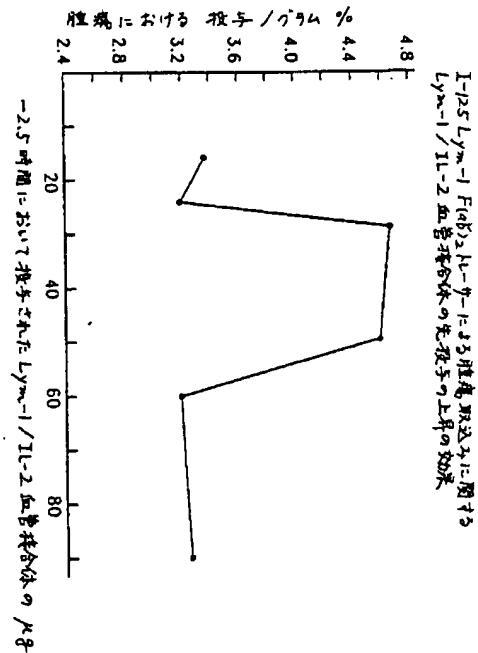


FIG. 3

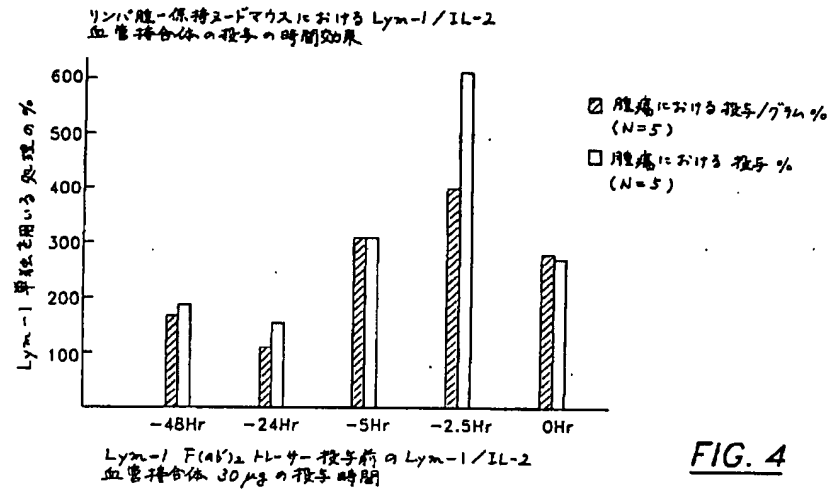


FIG. 4

国際調査報告

International Application No. PCT/US89/04513

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's Classification)

IPC(4): A61K 48/00 A61K 39/00 C07K 15/16 C12N 1/00  
U.S. Cl.: 424/9, 85.8; 530/387; 535/107

2. FIELD SEARCHED

U.S. 424/1.1, 9, 85.2, 85.7, 85.8;  
435/810; 435/808; 530/387; 535/107, 110

CHEMICAL ABSTRACTS SERVICES ON LINE, FILE BIOLOGICAL ABSTRACTS  
AND AUTOMATED PATENT SYSTEM. SEE ATTACHMENT FOR SEARCH TERMS.

3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Document	Relevance
Y	Cancer Research, Vol. 48(3), 1988, Kawase et al. "Combined therapy of mice bearing a lymphokine-activated killer-resistant tumor with recombinant interleukin 2 and an anti-tumor monoclonal antibody capable of inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity", pages 1173-1179. See abstract.	1-39
Y	Cancer Research, Vol. 48, 1988, Sands et al. "Correlation of Vascular Permeability and Blood Flow with Monoclonal Antibody Uptake by Human Gliomas and Renal Cell Carcinomas", pages 184-193. See abstract.	1-39
Y	J. of Biological Response Modifiers, Vol. 7(2), 1988, Sherrwood et al. "Soluble Glucan and Lymphokine-activated Killer (LAK) Cells in the Therapy of Experimental Hepatic Metastases", pages 183-198.	1-39
Y	Nature, Vol. 323, 4 September 1988, Philip et al. "Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ-interferon and interleukin-1", pages 88-89. See abstract, page 87, column 2, last paragraph and page 89, lines 2-7.	1-39
Y	JNCI, Vol. 76(3), March 1988, Rhyth et al. "Specific Targeting of Monoclonal Antibodies to Tumors with the Use of Monoclonal Antibodies", pages 501-510. See abstract.	1-39
Y	U.S., 4,723,094 (PARKER, ET AL.) 28 June 1988 (see abstract, column 4, lines 10-49 and column 5, lines 20-30).	1-39

4. SUMMARY OF THE INVENTION

18 December 1989

ISA/US

05 JAN 1990

FLORINA B. HOFFER

International Application No. PCT/US89/04513

4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (Continued)

Category	Document	Relevance
Y	Cancer Research, Vol. 48(3), 1988, Kawase et al. "Combined therapy of mice bearing a lymphokine-activated killer-resistant tumor with recombinant interleukin 2 and an anti-tumor monoclonal antibody capable of inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity", pages 1173-1179. See abstract.	1-39
Y	Cancer Research, Vol. 48, 1988, Sands et al. "Correlation of Vascular Permeability and Blood Flow with Monoclonal Antibody Uptake by Human Gliomas and Renal Cell Carcinomas", pages 184-193. See abstract.	1-39
Y	J. of Biological Response Modifiers, Vol. 7(2), 1988, Sherrwood et al. "Soluble Glucan and Lymphokine-activated Killer (LAK) Cells in the Therapy of Experimental Hepatic Metastases", pages 183-198.	1-39
Y	Nature, Vol. 323, 4 September 1988, Philip et al. "Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ-interferon and interleukin-1", pages 88-89. See abstract, page 87, column 2, last paragraph and page 89, lines 2-7.	1-39
Y	JNCI, Vol. 76(3), March 1988, Rhyth et al. "Specific Targeting of Monoclonal Antibodies to Tumors with the Use of Monoclonal Antibodies", pages 501-510. See abstract.	1-39
Y	U.S., 4,723,094 (PARKER, ET AL.) 28 June 1988 (see abstract, column 4, lines 10-49 and column 5, lines 20-30).	1-39

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT IDENTIFIED FROM THE SEARCH SHEET		
Category	Content of Document, with abstract, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
Y	U.S., A. 4,724,212 (EPSTEIN) 9 February 1984 (See abstract and column 7, lines 10-30 and 42-49).	1-39
Y	U.S., A. 4,724,212 (EPSTEIN) 9 February 1984 (see abstract).	1-39
A	Chemical Abstracts, Vol. 109, 1984, Burger et al., "The C terminus of the anaphylatoxin C3a generated upon complement activation represents a neoantigenic determinant with diagnostic potential", page 511. Abstract No. 127053u, J. Immunol., 1984, 141(2), 533-536.	1-39
A	Cancer Research, Vol. 40, June 1984, Spencer et al., "Limitations of radiolabeled Monoclonal Antibodies for Localization of Human Neoplasms, pages 3147-3151. See abstract.	1-39

## ATTACHMENT TO PDPH PCT/ISA/210, PART II.

## II. FIELDS SEARCHED/SEARCH TERMS:

C3a  
 C3a385  
 APS  
 Monoclonal (d) antibody  
 antibody  
 anaphylatoxin  
 in vivo  
 immunotherapy  
 vasopressin  
 leukotriene  
 lymphokine  
 immune?  
 immunconjugate  
 inflammagen  
 protease  
 Target

## 第1頁の続き

①Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

A 81 K	31/715		8317-4C
	37/02		8317-4C
	37/04		8317-4C
	37/12		8317-4C
	37/50		8317-4C
	37/54		8317-4C
	39/385	C	8413-4C
		L	8413-4C
	45/00		8415-4C
	48/02	A	8415-4C
C 07 K	15/14		7731-4H

優先権主張 ②1989年10月4日③米国(U S)④417,782

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成9年（1997）6月10日

【公表番号】特表平4-503945

【公表日】平成4年（1992）7月16日

【年通号数】

【出願番号】特願平1-511059

【国際特許分類第6版】

A61K 51/00 ADU

31/557

38/00

38/16

38/17

38/46

38/48

45/00 ABK

51/00

【F I】

A61K 43/00 ADU 8415-4C

31/557 9454-4C

45/00 ABK 8415-4C

49/02 A 9454-4C

37/02 9051-4C

37/04 9051-4C

37/12 9051-4C

37/54 9051-4C

37/547 9051-4C

## 手続補正書

平成 8 年 10 月 9 日



特許庁長官様

1. 事件の番号

平成11年特許願第511059号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ユニバーシティ・オブ・ワシントン・トリノビルニア

3. 代理人

住所 〒530  
大阪府北区南堀町2丁目1番2号  
住友銀行南堀町ビル  
電話 06-361-2021 (代)

氏名 弁護士 (0474) 澤見 久郎



4. 補正命令の付与

付与 (山形審判部と同時)

## 請求の範囲

1. 腫瘍転移の部位に集積する能力を有する遺伝性体、および前記腫瘍組織への血行供給を増加するよう関与配座媒体に結合された薬剤を備える、薬剤投与体。
2. 前記投与体が、正常で健康な血管内皮を透過することができないが、腫瘍組織の血管内皮を透過するのに十分な大きさである、請求項1に記載の投与体。
3. 前記薬剤が、血管内皮の活性部位において、血管透過性を増加するよう働く、請求項1に記載の投与体。
4. 前記薬剤が、血管内皮の活性部位において、局所的な炎症性反応を抑制または変化するように働く、請求項1に記載の投与体。
5. 抗腫瘍性の放射線同位体と組合わされた、請求項1、3または4に記載の投与体。
6. 抗腫瘍性の毒素と組合わされた、請求項1、3または4に記載の投与体。
7. 前記薬剤が、薬理的に活性な化合物を含む、請求項1、3または4に記載の投与体。
8. 前記薬剤が、炭水化物である、請求項1に記載の投与体。
9. 前記炭水化物が、グルカンおよびプロテオグリカンからなる群から選択される、請求項8に記載の投与体。
10. 前記薬剤が、糖質である、請求項1、3または4に記載の投与体。
11. 前記薬剤が、血小板活性化因子およびプロスタグランジンからなる群から選択される、請求項10に記載の投与体。
12. 前記薬剤が生体学的アミンである、請求項1、3または4に記載の投与体。
13. 前記配座媒体が、損傷を受け、炎症を起こし、または機能的に異常な血管内皮において選択的に発現される分子に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の投与体。
14. 前記配座媒体が、免疫グロブリンまたはその断片を備える、請求項1、3または4に記載の投与体。
15. 前記配座媒体が、モノクローナル抗体を備える、請求項1、3または4に記載の投与体。

5. 補正の対象

請求の範囲

6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正する。

以上

10. 前記配座媒体が、1つまたは2つ以上のリボソームを備える、請求項1、3または4に記載の投与体。
17. 前記リボソームが、80 nmのオーダーの直径を有する、請求項10に記載の投与体。
18. 前記配座媒体が、選択性の血管壁に選択的に集積する高分子量のデキストラン(70 150 KD)を備える、請求項1、3または4に記載の投与体。
19. 前記配座媒体が、30、300と200、000との間の分子量を有する高分子または粒子を備える、請求項1、3または4に記載の投与体。
20. 前記配座媒体が、腫瘍に見られるような炎症を起こした血管および機能的に異常な血管において循環する抗体またはその他の高分子に接近するようになる血管壁の内皮下成分に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の投与体。
21. 前記成分が、フィブロネクチン、ラミニン(laminin)、およびIV型コラーゲン、または内皮下組織の類似物質を備える、請求項20に記載の投与体。
22. 前記配座媒体が、血管壁、炎症を起こした血管壁のすぐ近くの環境、または腫瘍の壊死領域において活性化される凝固カスケードの成分に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の投与体。
23. 前記成分が、フィブリンおよびトロンビンを含む、請求項22に記載の投与体。
24. 前記配座媒体が、炎症を起こしていない血管組織でなく、炎症を起こした脈管組織の内皮細胞の中または上において選択的に発現される抗原に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の投与体。
25. 前記配座媒体が、炎症を起こした脈管組織への多形核白血球の付着の原因となる細胞付着分子を含む、請求項24に記載の投与体。
26. 前記配座媒体が、フィブリンを備える、請求項24に記載の投与体。
27. 前記配座媒体が、フィブロネクチンを備える、請求項24に記載の投与体。
28. 前記配座媒体が、フィブリン凝縮物を備える、請求項24に記載の投与体。
29. 前記配座媒体が、細胞障害、血小板または血小板凝集産物を備える、請求項24に記載の投与体。

30. 前配腎臓が、壊死性または炎症を起こした組織において放出されるペルオキシダーゼを含む、請求項29に記載の接合体。

31. 前記配腎臓体が、新しい血管組織の内皮細胞のりまたは上において選択的に発現される抗原に対して特異性を有する、請求項1、3または4に記載の接合体。

32. 腫瘍組織の診断のための方法であって、  
前記腫瘍組織への血液の供給を増加するように働く薬剤に接合されている流体を前記組織の部位に集める能力を有する有効な量の配送媒体を前記組織を有する宿主に投与するステップ、および  
それと同時にまたはその後、前記宿主に腫瘍の像を造る薬剤を投与するステップを備える方法。

33. 前記腫瘍の像を造る薬剤と接合された、前記組織の部位に集束する能力を有する配送媒体を備える接合体として、診断薬が投与される、請求項32に記載の方法。

34. 腫瘍組織の免疫診断のための方法であって、  
有効な量の請求項1の接合体を前記組織を有する宿主に投与するステップ、および

それと同時にまたはその後、前記組織の部位に集束する能力を有する配送媒体およびそれに接合された検出可能な薬剤を備える接合体を前記宿主に投与するステップを備える、方法。

35. 薬剤としての使用のために、接合体を構成するための方法であって、腫瘍組織の部位に集束する能力を有する配送媒体または前記組織をコードするメクレオチドを、前記腫瘍組織への血液供給を増加するように働く少なくとも1つの薬剤またはそれと同じものをコードするメクレオチドに付加することを備える、方法。

36. 腫瘍組織の部位に集束する能力を有する配送媒体に接合された、前記腫瘍組織の消滅のための薬剤組成物の調製において、前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く薬剤の使用。

37. 腫瘍組織の部位に集束する能力を有する配送媒体に接合された、前記腫

瘍組織の診断のための組成物の調製における、前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く薬剤の使用。

38. 腫瘍組織の部位に集束する能力を有する配送媒体、および前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く配送媒体に結合された薬剤を備える接合体、および  
抗腫瘍性の治療薬、  
を備える治療用キット。

39. 腫瘍組織の部位に集束する能力を備える配送媒体、および前記腫瘍組織への血液供給を増加するよう働く配送媒体に結合された薬剤を備える接合体、および  
腫瘍の像を造る薬剤、  
を備える診断用キット。